# 無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect *insect cell*

C297-0357A

アプリケーションデータ 6

## [質量分析法による合成タンパク質のN末端修飾の解析]

近年、タンパク質翻訳後修飾解析の重要性が高まっています。アミノ酸配列からどのような修飾が生じるかは、ある程度予測できますが、実際には実験を行い証明する必要があります。これらの修飾を簡便に解析する方法として、Transdirect *insect cell* とMALDI-TOF型質量分析装置を組合わせた手法をご紹介します。

■ *N*-ミリストイル化の解析例：*N*-ミリストイル化は、開始メチオニンの脱離が生じた後、新たに露出したN末端のグリシン残基に炭素数14からなる飽和脂肪酸が転移される修飾反応です。この修飾は、細胞情報伝達に関わるタンパク質に多く認められており、膜への結合、タンパク質-タンパク質相互作用において、非常に重要な役割を担うことが報告されています。*N*-ミリストイル化が生じることが知られているtGelsolin（文献1）をモデルタンパク質として解析を行いました。

### 実験フロー

tGelsolin-C末*strep*タグを
pTD1にクローニング

↓ mRNA合成

Transdirectによる
無細胞タンパク質合成

↓ ミリストイルCoA添加
または添加無しで合成

アフィニティ精製

↓

トリプシン消化

↓

MALDI-TOF MSおよび
MALDI-QIT-TOF MSで解析

＊裏面の方法もご参照ください。

### 結　果

| 推測されるN末端ペプチド断片 | 理論値 | ピークID |
|---|---|---|
| Met-Gly-Leu-Gly- -Arg | 1847.0 | 検出されず |
| Gly-Leu-Gly- -Arg | 1715.9 | A |
| O NH- Gly-Leu-Gly- -Arg | 1926.1 | B |

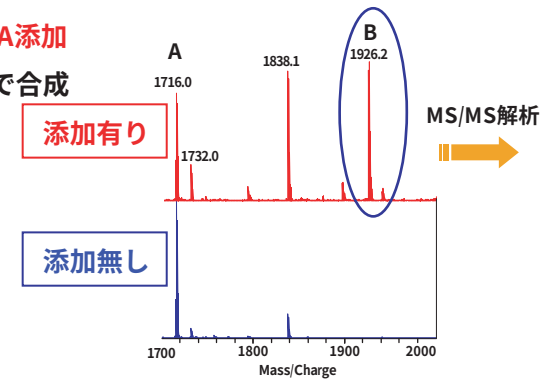


図1. トリプシン消化産物のMS解析

MS/MS解析

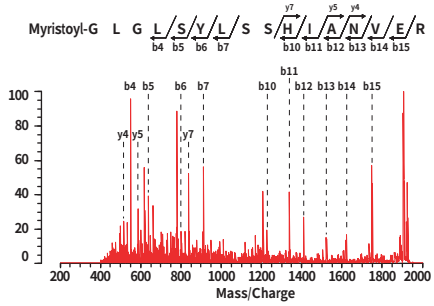


図2. m/z1926.2のMS/MS解析

これらのデータは、山口大学大学院医学系研究科教授内海俊彦先生との共同研究による成果です（文献2）。

翻訳反応液に基質となるミリストイルCoAを添加することで、*N*-ミリストイル化が生じたと考えられる *m/z* 1926.2 のペプチドフラグメントが検出されました（図1）。MS/MS解析を行ったところ、本ピークはミリストイル基を含むN末端のペプチドフラグメントであることが同定されました（図2）。同様の手法により、*N*-アセチル化、開始メチオニン脱離も解析することが可能です。

以上より、TransdirectがN末端に生じる代表的なタンパク質修飾を生じさせる能力があること、さらに質量分析装置と組合わせた本手法が、これらN末端修飾を解析する強力なツールとなることが示されました。

# 無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect *insect cell*

## 方 法

### ・発現ベクターpTD1へのサブクローニング及びmRNAの調製

C末端に*strep*-tag®※を導入した後、キット付属の取扱い説明書に従い、pTD1にクローニングした。
その後、キット付属の取扱い説明書に従ってmRNAの調製を行った。
※*strep*-tag®は、IBA社の登録商標です。

### ・タンパク質合成

キット付属の取扱い説明書に従って、1 mLの反応スケールでタンパク質合成を行った。
その際、基質となるミリストイルCoA（SIGMA社：M4414）を終濃度50μMとなるよう反応液に添加した。

### ・タンパク質の精製

Transdirect *insect cell*アプリケーションデータ②に記載の方法に従い精製した。

### ・MS解析

精製タンパク質（1μg）を電気泳動した後、ゲルを切り出し還元アルキル化を行った。
ゲル中でトリプシン（Promega社：V5280）消化を行い、0.1％TFAを含む50％アセトニトリルで消化ペプチドを抽出した。
抽出液を減圧乾燥により乾固させた後、10μLの0.1％TFAを含む50％アセトニトリルに溶解させた。
1μL分をプレートにスポットし、AXIMA CFR plusおよびAXIMA QITを用いて解析した。

### ・文献


1. Sakurai N. and Utsumi T., *J. Biol. Chem.*, 2006, 281:14288-14295
2. Suzuki T., Ito M., Ezure, T., Shikata, M., Ando, E., Utsumi, T., Tsunasawa, S., and Nishimura, O., *PROTEOMICS*, 2006, in press


## 技術に関するお問合せは・・・


**分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット**

TEL　(075) 823-1351
WEB　https://solutions.shimadzu.co.jp/form/biotech/contact.html
E-Mail　t-direct@shimadzu-biotech.jp


## Transdirect *insect cell* (P/N 292-30000-91)

■キット内容　・Insect Cell Extract（黄）×5本　・Reaction Buffer（青）×1本
・4mM Methionine（赤）×1本　・0.5μg/μL Control DNA（白）×1本
・0.5μg/μL pTD1 Vector（緑）×1本　・取扱説明書

■反応回数：40回（50μL合成反応系）
■保存温度：−80℃
■価　格：31,185円（税込）

〈ご注意〉・試薬キットロット間の合成量には、多少の差が見られますがご了承ください。
・概観及び仕様は予告なく変更することがありますのでご了承ください。
・本製品の使用は試験研究用のみです。臨床、医薬品・食品製造用途には使用できません。

**バルクキット（受注生産のため、詳細はお問い合せください。）**

| | | ■価格（税込） |
|---|---|---|
| 20キット相当分 | Transdirect *insect cell* バルクキット20 (P/N 292-30000-92) | 404,250円 |
| 50キット相当分 | Transdirect *insect cell* バルクキット50 (P/N 292-30000-93) | 924,000円 |
| 100キット相当分 | Transdirect *insect cell* バルクキット100 (P/N 292-30000-94) | 1,617,000円 |

バルクキットには、pTD1 VectorとControl DNAは含まれません。

※価格は2008年10月1日現在のものです。
※仕様および価格は改良のため，予告なく変更することがありますので，ご了承ください。

JQA-0376


島津製作所　分析計測事業部　604-8511　京都市中京区西ノ京桑原町1

バイオ・臨床ビジネスユニット
604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1（075）823-1351
http://www.shimadzu-biotech.jp/


取次店


3219-11802-500-IK